

test; ALST)、便粘液中好酸球のうち少なくとも1項目以上が行われた児とした。なおALSTはκカゼイン、ラクトフェリン、ヒトαラクトアルブミンの3抗原について実施することとし、各施設からの検体回収、検査実施、結果報告は臨床検査会社BMLに委託し、検査手技を統一した。

臨床症状から重症度を評価し、軽症例と重症化リスク(極低出生体重児、チアノーゼ型心疾患、消化管の外科治療後、染色体異常などの重篤な基礎疾患)のない中等症例で表1の適応基準を満たす症例は抗原負荷試験による診断確定を原則的必須事項とした。

表1 抗原負荷試験の適応基準

- ① 重症度がGrade 1、もしくはGrade IIであっても重症化のリスク因子(出生体重1500g未満、チアノーゼ型心疾患、消化管手術後、染色体異常などの重篤な基礎疾患)がない。
- ② 治療乳により便性が正常化している。
- ③ 肝機能異常や敗血症様の白血球高値、CRP上昇を伴う場合にはこれらの検査値が正常化している。
- ④ 治療乳で経腸栄養が確立し、少なくとも1週間以上良好な体重増加が得られている。
- ⑤ 牛乳特異的IgE抗体が3.50UA/ml未満で即時型反応のエピソードがない。
- ⑥ 他の基礎疾患がない、もしくは病状が安定している。
- ⑦ 保護者のインフォームドコンセントが得られている。

負荷試験の実施スケジュールを表2に示す。主治医が必要と判断した場合には1回負荷量を更にゆっくりと増量しても良いこととした。

表2 抗原負荷試験の実施スケジュール

負荷試験日数	試験前	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	...
授乳時間(例)					全量	全量	全量
1時					全量	全量	全量
4時					全量	全量	全量
7時					全量	全量	全量
10時		2ml/kg (1/10)	10ml/kg (1/2)	全量	全量	全量	全量
13時		5ml/kg (1/4)	全量	全量	全量	全量	全量
16時				全量	全量	全量	全量
19時				全量	全量	全量	全量
22時				全量	全量	全量	全量
負荷に用いる乳		乳糖除去乳			普通ミルク		
症状の評価	●	●	●	●	●	●	●

児が退院もしくは負荷試験が終了した時点で個別調査票を回収し、児の背景や発症時の状況、検査結果、負荷試験の有無と結果などを検討した。なお、本調査は各調査医療施設での倫理委員会の承認を得ているとともに、症例登録ならびに負荷試験の実施にあたっては保護者からのインフォームドコンセントが得られている。

C. 研究結果

C-1 登録症例の背景

協力の得られた126施設から平成23年3月21日までに84例の登録があり、内49例(58.3%)の調査票を回収した。出生時在胎週数の中央値は37.6週(25.7-41.4)で、在胎37週未満の早産児の占める割合は40.8%(20/49)であった。出生体重の中央値は2560g(684-3518)であり、1000g未満の児が4例、1000g~1500g未満の児が7例で、低出生体重児の占める割合は49.0%(24/49)であった。男女比は31:18で男児に多い傾向がみられた。

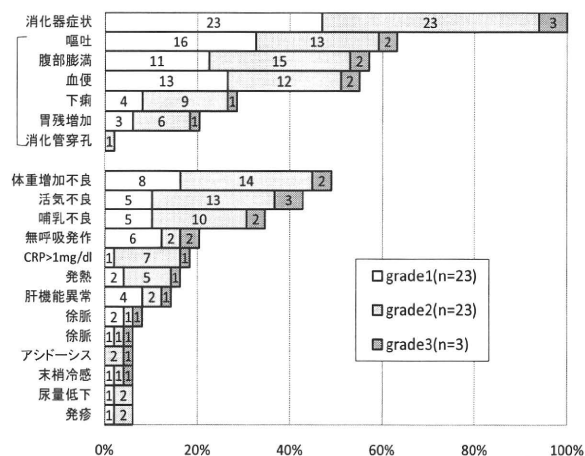
C-2 発症時の状況

発症日齢の中央値は日齢7(0-46)で、日齢3までに17例(34.7%)、日齢6までに24例(49.0%)が発症していた。発症時の栄養方法は人工乳単独が29例(59.2%)で最も多く、以下母乳栄養、母乳と人工乳の混合栄養がそれぞれ7例(14.3%)であった。極低出生体重児では母乳への強化パウダー添加後に発症したものが5例(10.2%)認められた。

C-3 臨床症状(図1)

重症度はgrade1(軽症)23例、grade2(中等症)23例、grade3(重症)3例であった。全例で消化器症状を認め、特に嘔吐、腹部膨満、血便の頻度が高かった。消化管穿孔が1例で認められたが、ミルクアレルギーとの因果関係は不明であった。消化器症状以外では体重増加不良や活気不良、哺乳不良などの全身症状や無呼吸発作の頻度が高かった。感染症を思わせる発熱、CRP上昇や肝機能異常を伴う例も認められた。明らかなショック症状の児はいなかったが、代謝性アシドーシスが3例で認められた。

図1 症状・検査異常の出現頻度



C-4 アレルギー関連検査と抗原負荷試験

ALST、牛乳抗原特異的 IgE 値、便粘液中好酸球の実施率はそれぞれ 100%、91.8%、81.6%であり、陽性率はそれぞれ 67.3%(33/49)、6.7%(3/45)、27.5%(11/40)であった。診断を目的とした抗原負荷試験が実施されたのは 23 例(46.9%)で、負荷試験実施日齢の中央値は 19(3-77)、負荷試験実施までの日数の中央値は 16 日(1-54)であった。11 例(47.8%)で陽性症状が認められたが、症状はいずれも軽症の消化器症状であり、治療乳を再開することで速やかに消失した。

抗原負荷試験の結果をもとに各スクリーニング検査の検査効率を算出すると、ALST の感度は 72.7%、特異度は 41.7%、牛乳抗原特異的 IgE の感度は 0%、特異度は 91.7%、便粘液中好酸球の感度は 11.1%、特異度は 63.6%であった。

D. 考察

本研究は新生児ミルクアレルギーを対象に、抗原負荷試験をベースとした初めての前方視的疫学的調査である。ただし本調査の対象は症状などからミルクアレルギーが疑われた児であり、症例の背景や臨床症状などのデータは負荷試験が実施されていない症例も含めた集計であること、また抗原負荷試験が実施されていない重症例は各検査の感度・特異度に反映されていないことに留意する必要がある。

患者背景は従前の報告と同様の傾向で、男児に多く、早産・低出生体重児の発症が少なくなかった。また発症日齢は約半数が早期新生児期に発症し、その症状は 100%消化器症状を伴っていた。重症度 grade2 (中等症)以上では消化器症状以外の症状が稀ではなく、非特異的な全身症状や感染症を疑わせる発熱、CRP 値の上昇を認める頻度も高かった。

ALST は近年本疾患をはじめとする細胞性免疫依存性食物アレルギーの補助診断として注目されているが、一部の専門施設でのみ実施可能な検査であり、検査へのアクセスが課題となっていた。本研究では将来的な一般受託を見据え、臨床検査会社 BML に検査の実施を一括委託した。今回、ALST の実施率は 100%であり陽性率も高かったが、ALST 陽性であっても抗原負荷試験陰性という症例も存在した。今回採用した各抗原のカットオフ値は主に乳児期以降の正常コントロールをもとに算出されたものであり、新生児期のカットオフ

値は今後検討が必要と考えられる。

一方で牛乳抗原特異的 IgE と便粘液中好酸球の陽性率は過去の後方視的調査と比べ陽性率が低かった。これは BML 社での ALST 検査には本研究への登録を必須条件としているため、抗原特異的 IgE が陰性であった症例では ALST を実施するために本研究に登録されやすくなり、抗原特異的 IgE 陽性例は ALST が実施されずに登録から漏れている可能性がある。また従来、抗原特異的 IgE が陰性であった時点でミルクアレルギーが否定されていた児が「診療の手引き」や ALST 検査の普及によって、ミルクアレルギー疑い例としてより多く認識されるようになった結果を反映しているのかもしれない。なお BML 社による ALST 検査は平成 23 年 2 月より一般受託が開始されている。

抗原負荷試験は約半数の症例に対して実施されていたが、本来負荷試験が実施されるべき軽症例であっても負荷試験が実施されていない症例も多かった。背景として、実際の診療にあたる新生児科医にとって児の状態を悪化させるリスクの高い抗原負荷試験に対する抵抗が根強いこと、NICU への入院期間が長期化する可能性があること、保護者からの同意が得にくいことなどが考えられる。しかしながら、抗原負荷試験で陽性症状が認められたものは半数以下であり、負荷試験陰性例では早期に不必要な治療乳を中止することが出来た。また陽性症状は軽症の消化器症状が中心であり、少なくとも軽症例に対する本調査の負荷試験プロトコールは新生児に対しても安全に実施することが可能であった。現在流通しているアレルギー治療用ミルクは必ずしも栄養学的に十分とは言えないことから、抗原負荷試験による診断確定は新生児・乳児期の適切な栄養管理をすすめる上でも重要であり、今後さらなる有用性・安全性の検討が必要である。

E. 結論

今回の調査で新生児ミルクアレルギーの詳細な病態、臨床像が明らかとなった。本疾患の診断においては、いくつかの検査が試みられているが、いずれも補助診断に過ぎず、抗原負荷試験に代わるものではない。それぞれの検査の特徴、限界を十分に認識し、経口負荷試験が Gold Standard であると考えer必要がある。

軽症の新生児ミルクアレルギー疑い例に対す

る負荷試験は安全に実施可能と考えられた。次年度研究では登録症例の追跡調査を行い、本疾患の予後について検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宮沢篤生, 今井孝成, 板橋家頭夫: 消化器外科疾患に多い? ミルクアレルギー. Neonatal Care 23-11: 1118-1125, 2010
- 2) 宮沢篤生, 今井孝成, 板橋家頭夫: アレルギー診療の新しい展開 食物アレルギー 新生児消化器症状型. 小児科臨床 63-12: 2451-2460, 2010

2. 学会発表

- 1) 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 今井孝成, 木村光明, 大塚宜一: 新生児乳児消化管アレルギー 最近の動向 新生児科の立場から. 第47回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2010. 12
- 2) 木村光明, 田口智英, 楢林成之, 王茂治, 宮沢篤生, 板橋家頭夫, 橋口明彦: 臨床検査会社による牛乳蛋白特異的リンパ球刺激試験 (ALST)測定. 第47回日本小児アレルギー学会. 横浜. 2010. 12

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギー発症予防と抗原低減化に関する研究
—食物アレルギー発症抑制及び抗原解析に関する研究—

研究分担者 穂山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
研究協力者 佐伯 宏樹 北海道大学 大学院水産科学研究院 教授
森山 達哉 近畿大学農学部 応用生命化学科 准教授
手島 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長
安達 玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長

研究要旨

【発症抑制】 β -カロテン摂取により OVA 投与 3 時間で脾臓、腸間膜リンパ節の CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の割合は増加する傾向にあり、同様に KJ1-26⁺CD4⁺Foxp3⁺の割合は増加する傾向にあった。 β -カロテン強化摂取は OVA 経口摂取後短時間に OVA の oral tolerance を促進することが示唆された。

【魚卵解析】イクラ・アレルゲンであるリポビテリン (Lv) の消化特性について検討した。Lv はトリプシン消化耐性を有しているものの、ペプシンで速やかに消化され、IgE 結合能も顕著に低下した。また、マウスに投与した Lv においても胃内での速やかな分解が確認できた。以上の結果から、アレルゲンとしての Lv の胃内消化耐性は、イクラ主要アレルゲンである β' -コンポーネントよりも弱いと判断した。

【果実解析】モモ含有医薬部外品による感作が成立している可能性を調べるために、化粧品用のモモエキスに対して患者血清 IgE の結合性の有無を ELISA やイムノブロットにて検討した。その結果、ELISA にて、モモアナフィラキシーの患者血清が健常人の場合と比べて有意に高い IgE 結合性を示した。

A. 研究目的

発症抑制では、卵白アルブミン特異的 TCR Tg マウスである DO11.10 マウスを用いて β -カロテン摂取による食物アレルギー発症抑制への影響について検討した。

魚卵解析では、アレルギー表示推奨品目であるイクラには、二種類のアレルゲンタンパク質、 β' -コンポーネント (β' -c) とリポビテリン (Lv) が含まれている。このうち、 β' -c の IgE 結合能は高い消化耐性を有し、ペプシン-トリプシン消化後も強い IgE 結合能を有する高分子断片が残存する。一方、Lv の消化耐性については、これまで知見がなかった。そこで本研究では、Lv のアレルゲン性に対するプロテアーゼ消化の影響について検討した。

果実解析では、主に成人における果実・種実類などの植物性食物アレルギーの抗原の特性解析を目的として、モモやモモエキスなどの対象サンプルからタンパク質を抽出し、患者血清や作製抗体を用いたイムノブロットング法及び ELISA 法によって原因抗原の探索や変動解析の検討などを行った。

B. 研究方法

発症抑制：C. Cg-Tg (Do11.10) 10D10/J (卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR-Tg マウス) の雌 (7 週齢) を購入し、1 週間順化した後、Blank 群、Control 群、 β -カロテン摂取群、 β -カロテン摂取+OVA 経口投与群の 4 群にわけ、各飼料を 1 週間自由摂取させた。 β -カロテンは標準粉末飼料に混合 (2 mg/100 g) した。飼料摂取後に OVA (1 mg/匹) を生理食塩水に調製し、Control 群と β -カロテン摂取+OVA 経口投与群に経口投与し、投与 1、3 時間後に解剖を行った。また、Blank 群と β -カロテン摂取群には生理食塩水を経口投与した。採取した脾臓 (SP)、腸管膜リンパ節 (MLN)、パイエル板 (PP) は 40 μ m のセルストレーナーに通してシングルセルにした。それぞれの細胞を RPMI 培地で 2 回洗浄 (1500RPM、5 分、4 $^{\circ}$ C) し、細胞浮遊液を調製した。Flow Cytometer (FACS) を用いて表面抗原 (CD3/CD4/CD8a/B220、CD11c/CD103/B7-H1、CD4/CD44/CD62L/KJ1-26、CD4/KJ1-26/Foxp3) を測定した。

魚卵解析：生鮮シロザケ卵より精製した Lv を 1%ペプシンまたはトリプシンで in vitro 消化し、その分解過程を SDS-PAGE によって観察した。次に、イクラアレルギー患者血清と抗 Lv-ウサギ

IgG (a-Lv) を用いて、Lv 消化物の抗原性変化を調べた。さらに、Lv と β' -c を含むイクラ卵黄タンパク質を ICR マウスに経口投与 (2.5g/kg) した後、消化管内容物を両タンパク質の抗体を用いて検出した。これによって、両アレルゲンの消化管内における分解状況を観察した。

果実解析：モモ、化粧品用モモエキス、大豆 (豆乳)、牛蒡、大豆加工食品などから抽出液を作製し、アレルギーを発症した患者の血清やウサギ等で作製した特異抗体を用いて、イムノブロットィング法や ELISA 法によって原因抗原の探索や検出、IgE 結合性解析などを行った。

C. 研究結果

発症抑制： β -カロテン摂取のみで PP の CD4⁺、CD8⁺T 細胞の割合は増加する傾向にあった。また、 β -カロテン摂取+OVA 投与 3 時間で PP の CD4⁺、CD8⁺T 細胞の割合は増加する傾向にあった。また、KJ1-26⁺CD4⁺CD8⁻ T 細胞の割合が増加する傾向にあった。 β -カロテン摂取+OVA 投与 3 時間で SP、MLN の CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の割合は増加する傾向にあり、同様に KJ1-26⁺CD4⁺Foxp3⁺ の割合は増加する傾向にあった。 β -カロテン摂取で PP の CD3⁺ 細胞 (T 細胞) が増加する傾向にあった。また、 β -カロテン摂取+OVA 投与 1、3 時間の PP で CD3⁺ 細胞が増加する傾向にあった。 β -カロテン摂取+OVA 投与 1、3 時間の PP で CD11c⁺B7-H1⁺細胞 (樹状細胞) の割合は増加する傾向にあった。

魚卵解析：in vitro において、Lv はペプシンで速やかに消化され、患者血中 IgE との反応性を著しく低下させた。一方、トリプシン消化では、Lv 重鎖の低分子化は確認できたものの、連続的な断片化は観察できず、高分子成分が多量に残存した。また、IgE 結合能の低下もわずかだった。マウスに投与した Lv においても胃内での分解が確認でき、腸管内に達した時点では主要成分が大きく減少していた。ただし、腸管内では、それ以上の低分子化は観察できなかった。

果実解析：モモ含有医薬部外品による感作が成立している可能性を調べるために、化粧品用のモモエキスに対して患者血清 IgE の結合性の有無を ELISA やイムノブロットにて検討した。その結果、ELISA にて、モモアナフィラキシーの患者血清が健常人の場合と比べて有意に高い IgE 結合性を示した。

D. 考察

発症抑制： β -カロテン摂取により OVA 投与 3 時間で脾臓、腸間膜リンパ節の CD4⁺Foxp3⁺T 細胞の割合は増加する傾向にあり、同様に KJ1-26⁺CD4⁺Foxp3⁺ の割合は増加する傾向にあった。 β -カロテン強化摂取によって PP における CD4⁺CD8⁻T 細胞の比率の増加が観察されており、同時に CD4⁺CD28⁺T 細胞の比率の増加も認められた。 β -カロテン摂取によりパイエル版で CD11c⁺B7-H1⁺細胞 (樹状細胞) の割合は増加する傾向にあった。強化カロテン摂取は経口抗原感作による腸管免疫系の CD4⁺T 細胞活性化に影響していることが示唆された。

魚卵解析：in vitro および in vivo のいずれにおいても、Lv はペプシンで容易に分解された。また、その抗原性は、消化に伴って顕著に低下した。これらの変化は消化耐性を有する β' -c の挙動とは全く異なっている。イクラ中の Lv 含有量は β' -c の約 8 倍に達するが、イクラアレルギー患者の両抗原に対する反応性は、Lv よりも β' -c のほうが極めて強い。この原因は、両アレルゲンの消化耐性の相違に起因している可能性がある。一方、Lv はトリプシンに対して高い消化耐性を有していた。それゆえ、in vivo において胃中で消化できなかった Lv 断片は、顕著な消化を受けずに腸管中を移行する可能性がある。果実解析：モモによるアナフィラキシーの症例が増加傾向を示しているが、化粧品・石けんなどの医薬部外品に含まれるモモエキスが感作源となっている可能性が示された。今後はモモエキス中のどのような抗原分子が関与しているのかを明らかにする必要がある。

E. 結論

発症抑制： β -カロテン強化摂取は OVA 経口摂取後短時間に OVA の oral tolerance を促進することが示唆された。

魚卵解析：イクラ・アレルゲンである Lv と β' -c の消化耐性を比較すると、Lv のペプシン消化耐性は低く、胃内消化によって抗原性が低下する可能性が示唆された。

果実解析：近年のモモのアナフィラキシーの発症機序の一つの可能性として、化粧品等の医薬部外品に含まれるモモエキスが関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 清水 裕, 佐伯宏樹. 魚卵アレルギーの本体と性状, 魚貝類アレルギーの科学, 水産学シリーズ 122, pp. 47-59, 恒星社厚生閣, 2010.
- 2) 佐伯宏樹, 食物アレルギーA to Z 第一出版, pp. 57-62, 2010.
- 3) Sato Y., Akiyama H., Matsuoka H., Sakata K., Nakamura R., Ishikawa S., Inakuma T., Totsuka M., Sugita-Konishi Y., Ebisawa M., Teshima R., J Agric Food Chem., 58, 7180-7186 (2010)
- 4) Abbott M., Hayward S., Ross W., Godefroy S.B, Ulberth F., Van Hengel A. J., Roberts J., Akiyama H., Popping B., Yeung J.M, Wehling P, Taylor S.L, Poms R.E, Delahaut P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, J. AOAC Int., 93, 442-450 (2010)
- 5) 清木興介, 織田浩司, 柴原裕亮, 蒲生玲子, 有馬優美, 酒井信夫, 中村厚, 安達玲子, 塩見一雄, 穠山浩, 手島玲子, 加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討, 食品衛生学雑誌, 51, 133-138 (2010)
- 6) Sakai S., Adachi R., Akiyama H., Teshima R., Doi H., Shibata H., Determination of walnut protein in processed foods by enzyme-linked immunosorbent assay interlaboratory study, J AOAC Int., 93, 1255-1261 (2010)
- 7) Sakai Y., Ishihata K., Nakano S., Yamada T., Yano T., Uchida K., Nakao Y., Urisu A., Adachi R., Teshima R., Akiyama H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, J Agric Food Chem., 58, 8145-8151 (2010)
- 8) Nakamura K., Fujioka S., Fukumoto S., Inoue N., Sakamoto K., Hirata H., Kido Y., Yabu Y., Suzuki T., Watanabe Y., Saimoto H., Akiyama H., Kita K., Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among Trypanosoma brucei subspecies, Parasitology International, 59, 560-564 (2010)
- 9) Akiyama H., Imai T., Ebisawa M., Japan Food Allergen Labeling Regulation - History and Evaluation, Advances in Food & Nutrition Research, in press (2011)

2. 学会発表

- 1) シロザケ卵アレルギータンパク質間の抗原交差性, 前田絢子, 清水 裕, 岸村栄毅, 渡辺一彦, 原 彰彦, 佐伯宏樹, 平成 22 年度日本水産学会秋季大会, 講演要旨集 p. 90, (2010, 10).
- 2) シロザケ卵黄タンパク質の消化管内における挙動の検討, 藤田真五, 清水 裕, 渡辺一彦, 原 彰彦, 岸村栄毅, 佐伯宏樹, 平成 22 年度 日本栄養・食糧学会大会, 講演要旨集 p. 155, (2010, 10).
- 3) タラコ主要アレルギーの内部配列および IgE 結合部位の検討, 加賀谷恵, 清水 裕, 渡辺一彦, 原 彰彦, 岸村栄毅, 佐伯宏樹, 平成 22 年度 日本栄養・食糧学会大会, 講演要旨集 p. 156, (2010, 10).
- 4) シロザケ卵アレルギーのエピトープ同定, 清水 裕, 岸村栄毅, 渡辺一彦, 原 彰彦, 佐伯宏樹, 平成 23 年度日本水産学会春季大会 No. 815, (2011, 3).
- 5) 足立厚子, 井上友介, 金澤典子, 松尾正文, 佐々木祥人, 森山達哉「大豆アレルギーにおける大豆プロフィリン Gly m 3 の関与について」第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会(京都) 2010
- 6) 原田 晋, 森山 達哉, 柳原 美弥子, 田中 昭「初回摂取時に症状発現を認めたローヤルゼリーアレルギーの 2 例」第 22 回日本アレルギー学会春季臨床大会(京都) (2010, 4)
- 7) 末森祐輔, 近重順帆, 矢野えりか, 村瀬浩, 水野雅敏, 森山達哉, 河村幸雄「大豆クラス 2 食物アレルギー Glym3 の多様性と特性解析」2010 年度 日本農芸化学会 関西支部大会(奈良) (2010, 10)
- 8) Akiyama H., The Regulatory Situation in Japan - Japanese Labeling and Testing Requirements for Allergens in Food -, Sixth Workshop on Food Allergen Methodologies, (2010. 5)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

食物アレルギーの免疫療法の開発とその臨床応用 —食物アレルギーの免疫学的制御に関する研究—

研究分担者 大嶋 勇成 福井大学医学部病態制御医学講座小児科学 教授
研究協力者 眞弓 光文 福井大学 理事・副学長

研究要旨

経口免疫寛容の誘導による食物アレルギーの治療法を確立するため、OVA の経口投与で即時型アレルギー性下痢症状を呈する食物アレルギー動物モデルを用い、抗原感作成立状態から免疫寛容を誘導する方法を検討した。オボアルブミン (OVA) で感作が成立した後、オリゴマンノースを結合させたリボゾームに OVA を封入 (OVA-OML) し、鼻腔粘膜投与を行うと、OVA 経口チャレンジにより惹起される IgE 依存性の即時型下痢症状と血清 OVA 特異的 IgE 値の上昇は抑制された。OVA-OML 投与群の腸管膜リンパ節 CD8 陽性 T 細胞は即時型下痢症状を抑制する機能を有していた。食物抗原をオリゴマンノースを結合させたリボゾームに封入して経鼻粘膜投与する方法は、調節作用を持つ CD8 陽性 T 細胞を誘導し、食物アレルギーの新規治療法となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

乳幼児期の食物アレルギー患者の多くは成長とともに原因食物を摂取しても症状が出なくなることが知られている。このアウトグロウの機序として消化能力の発達に加え、経口免疫寛容の成立が関与していると考えられている。食物アレルギーの治療としては原因食物の除去が基本となるが、誤食の危険性や食事制限による患児や家族への負担が問題となる。そこで、食事制限に代わる治療手段として経口免疫寛容を積極的に誘導することで食物アレルギーのアウトグロウを導く方法が期待される。

これまでの我々の研究研究において、抗原感作が成立して抗原特異的 IgE と抗原特異的 Th2 細胞が存在する状態でも、アレルギー性下痢症状を抑制する機能を持つ CD8 陽性 T 細胞が、抗原感作を行ったマウスの脾臓中に存在することが明らかとなった。そこで、即時型アレルギー症状の発症を抑制する CD8 陽性 T 細胞を *in vivo* で誘導する免疫療法を開発することにより、食物アレルギーの新規治療法としての可能性を検討した。

B. 研究方法

IgE 依存性の即時型下痢症状を呈する食物アレルギーモデルとして Brandt ら (JCI 112:1666) が報告した方法に準じ Balb/c マウスにオボアルブミン (OVA) をアラムと共に腹腔免疫をした後、OVA を隔日経口投与して即時型アレルギー性下痢症状を誘発させる食物アレルギーモデルを用いた。

食物抗原の様な外因性抗原が、抗原提示細胞に

より貪食され MHC class II と抗原ペプチド複合体として抗原提示される場合、通常は CD4 陽性 T 細胞の免疫応答が誘導され、CD8 陽性 T 細胞の免疫応答はほとんど誘導されない。そこで、食物抗原に対する CD8 陽性 T 細胞の免疫応答を誘導するため、マンノースレセプターを介してクロスプレゼンテーションされることを期待して、オリゴマンノースを結合したリボゾーム (OML) に抗原となる OVA を封入し、投与する方法を検討した。

抗原感作が成立したマウスに OVA-OML を 5 日間連続で鼻腔粘膜投与し、最終投与 3 日目から OVA の経口チャレンジを行い、誘発される即時型下痢症状が抑制されるか否かを検討した。OVA-OML 投与による抗原特異的 Ig 値の変化や、腸管洗浄液中の抗原特異的 IgA 値、腸間膜リンパ節などにおけるリンパ球表面マーカー発現を解析した。また、OVA-OML を点鼻投与した後、OVA の経口チャレンジを行ったマウスの腸管膜リンパ節から CD8 陽性 T 細胞を分離し、感作マウスに輸注し、CD8 陽性 T 細胞輸注が即時型下痢症状を抑制する機能を持つか否かを検討した。

実験動物の取り扱いおよび実験方法に関しては、福井大学医学部動物実験委員会での承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

1) OVA-OML 点鼻投与の抗原特異的即時型下痢症状抑制効果

OVA-OML 非投与群では、OVA 感作マウスに OVA の経口チャレンジを行うと、チャレンジ 2 回目から即時型下痢症状を呈するようになるが、

OVA-OML 点鼻投与群では、即時型下痢症状の発現が抑制された。OVA の代わりにオボムコイドをアラムと共に腹腔投与しオボムコイドに対する感作を成立させたマウスに OVA-OML 点鼻投与を行った後、オボムコイドを経口チャレンジした場合には即時型下痢症状は抑制されなかった。

2) OVA-OML 点鼻投与による即時型下痢症状抑制効果におけるオリゴマンノース標識の重要性

OVA をオリゴマンノース非標識のリポソームに封入したものや、OVA をリポソームに封入せずに PBS 溶液として点鼻投与した場合ではいずれも OVA 経口チャレンジにより誘発される下痢症状は抑制されなかった。

3) OVA-OML 投与が OVA 特異的抗体価に及ぼす影響

OVA 経口チャレンジ前の OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 抗体価は、OVA-OML 投与群と非投与群との間に有意な差を認めなかった。一方、OVA 経口チャレンジに伴い、血清中 OVA 特異的 IgE、IgG1、IgG2a 抗体価は両群とも上昇した。しかし、OVA-OML 投与群では非投与群に比べて OVA 特異的 IgE の上昇が抑制されるのに対し、OVA 特異的 IgG1 の上昇は亢進していた。また、分泌型 IgA 産生の指標として腸管洗浄液中の OVA 特異的 IgA 値を測定すると、OVA-OML 投与群の方が非投与群より OVA 特異的 IgA 値は高値を示した。

4) OVA-OML 投与が腸間膜リンパ節リンパ球サブセットに及ぼす影響

経口免疫寛容の成立には腸管膜リンパ節が重要な役割を持つことが報告されていることから、OVA 経口チャレンジ後に腸間膜リンパ節単核細胞を分離し、リンパ球の表面マーカーおよび Foxp3 など調節性 T 細胞のマーカーとしてこれまで報告されている細胞マーカーの発現を解析した。その結果、OVA-OML 点鼻投与群では CD28 陰性 CD8 陽性 T 細胞と Foxp3 陽性 CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の比率が非投与群より増加していた。一方、CD122 陽性 CD8 陽性 T 細胞や CD103 陽性 CD4 陽性細胞の割合には有意な差を認めなかった。

5) 腸管膜リンパ節 CD8 陽性 T 細胞輸注による即時型下痢症状の抑制効果

OVA 経口チャレンジ後に腸間膜リンパ節単核細胞を分離し、さらにその一部から CD8 陽性 T 細胞を分離して、あらかじめ OVA 感作を行ったマウスの尾静脈から輸注した。輸注翌日より OVA 経口チャレンジを行ったところ、OVA-OML 投与群から分離した単核細胞を輸注したマウスでは即

時型下痢症状が抑制されたが、OVA-OML 非投与群から分離した単核細胞を輸注したマウスには抑制効果は認められなかった。OVA-OML 投与群から分離した CD8 陽性 T 細胞の輸注では、全単核細胞を輸注した場合と比較して、即時型下痢症状の抑制効果は弱いものの、輸注を行わなかった場合に比べ有意な抑制効果を認めた。

OVA 経口投与による OVA 特異的 IgE 値の上昇は、CD8 陽性 T 細胞の輸注によっても抑制されたが、腸管洗浄液中の OVA 特異的 IgA 値の有意な上昇は認められなかった。

D. 考察

オリゴマンノース結合リポソームに食物抗原を封入し口腔内に投与する方法は、即時型アレルギー下痢症状の発症を抑制する新たな免疫療法となる可能性が示唆された。リポソームに封入した抗原以外の抗原に対しては、アレルギー性下痢症状の抑制効果が認められなかったことより治療効果は抗原特異的であると考えられた。また、オリゴマンノース非標識リポソームに抗原を封入したものをを用いた場合、抑制効果が認められず、抑制効果の獲得にはマンノース標識を加えることが重要と考えられた。

オリゴマンノース結合リポソームを用いた免疫療法により、OVA 特異的 IgE 産生亢進反応の減弱と分泌型 IgA 産生の増強、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞に加え CD28 陰性 CD8 陽性 T 細胞の調節性 T 細胞のマーカーを発現した細胞群の腸間膜リンパ節での増加を認めた。CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞は経口免疫寛容に関与することが指摘されており、CD28 陰性 CD8 陽性 T 細胞も抑制機能を発揮することが報告されている。腸間膜リンパ節の CD8 陽性 T 細胞を輸注すると即時型下痢症状が部分的に抑制されることから、オリゴマンノース結合リポソームを用いた免疫療法では CD4 陽性調節性 T 細胞以外に CD8 陽性調節性 T 細胞が誘導されている可能性が示唆され、OVA 特異的抗体産生の変化も含め、複数の機序が協調して抑制機能に関与していると考えられた。

E. 結論

抗原封入マンノース結合リポソームの鼻粘膜投与は、即時型食物アレルギーに対する新たな免疫療法となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報
特になし

研究会 2011. 03. 8 京都

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大嶋勇成 食物アレルギーと腸管免疫 小児科診療 73:1093-1098(2010)
- 2) 大嶋勇成 食物アレルギーの治癒機転 アレルギー・免疫 17:1023-1028(2010)
- 3) 大嶋勇成 抗アレルギー薬 新薬展望 2011 47:S1 241-246(2011)
- 4) 大嶋勇成 周産期の環境と小児アレルギー疾患発症のリスク 免疫反応の発達 周産期医学 in press
- 5) 大嶋勇成 アレルギー疾患発症に関わる免疫システム アレルギーの臨床 in press
- 6) Ohshima Y Roles of regulatory T cells in oral tolerance and food allergy. In "Regulatory T cells" ed by Hayashi RS

2. 学会発表

- 1) Ohshima Y, Yasutomi M, Shirasaki H, Kawakita A, Mayumi M Intranasal administration of antigen entrapped into oligomannose-coated liposome impedes development of oral antigen-induced allergic diarrhea. 14th International Congress of Immunology 2010 Aug 22-27, Kobe
- 2) Yasutomi M, Ohshima Y, Shirasaki H, Kawakita A, Mayumi M. Erythromycin inhibits IL-17 production through modulating monocyte-derived dendritic cell function. 14th International Congress of Immunology 2010 Aug 22-27, Kobe
- 3) 大嶋勇成、安富素子 ワークショップ：動物モデルによる病態解明の進歩：食物アレルギーモデルを用いた食物アレルギー耐性獲得機序の解析 第60回日本アレルギー学会秋季学術大会 2010. 11. 25-27 東京
- 4) 大嶋勇成 食物アレルギーの耐性獲得機序と免疫療法の今後 第19回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会 2011. 2. 12
- 5) 大嶋勇成 アレルギー性疾患の発症・進展・重症化の予防について 第6回日本改善学会北陸支部学術総会 2011. 3. 6
- 6) 大嶋勇成 食物アレルギーの耐性獲得機序と耐性誘導の試み 第7回京都臨床アレルギー

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

